

(19) KOREAN INTELLECTUAL PROPERTY OFFICE

KOREAN PATENT ABSTRACTS

(11)Publication
number: 1020010051095 A
(43)Date of publication of application:
25.06.2001

(21)Application number: 1020000061231
(22)Date of filing: 18.10.2000

(71)Applicant: KOREA RESEARCH
INSTITUTE OF
BIOSCIENCE AND
BIOTECHNOLOGY

(72)Inventor: KIM, GI YEON
KWAK, SANG SU
KWON, SEOK YUN
LEE, HAENG SUN

(51)Int. Cl. C12N 15 /29

(54) PEROXIDASE GENOME GENE DERIVED FROM LPOMOEA BATATAS AND PROMOTER THEREOF

(57) Abstract:

PURPOSE: A peroxidase genome gene derived from *Lpomoea batatas* and a promoter thereof are provided, therefore the peroxidase genome gene can be effectively used in the development of environmental stress resistant plants.

CONSTITUTION: The peroxidase genome gene is represented by sequence ID No. 1. The promoter is represented by sequence ID No. 2 and its activity is induced by environmental stresses, in which the environmental stresses can be injury, active oxygens, heat, water, temperature, salts, air pollution, ultraviolet rays or heavy metals. The DNA consists of the promoter of sequence ID No. 2 and DNA sequence encoding useful products, in which the DNA sequence encoding useful products recognizes stresses of ABA, methyl jasmonate, injury, low oxygen concentration, active oxygen, hear or nitrogen. Tobacco callus (KCTC 0875BP) producing useful products by inducing of environmental stresses is prepared by transformation of an expression vector containing the promoter of sequence ID No. 2 and DNA sequence encoding useful products.

COPYRIGHT 2001 KIPO

Legal Status

Date of request for an examination (20010811)

Notification date of refusal decision (00000000)

Final disposal of an application (registration)

Date of final disposal of an application (20040611)

Patent registration number (1004372660000)

BEST AVAILABLE COPY

Date of registration (20040614)

Number of opposition against the grant of a patent ()

Date of opposition against the grant of a patent (00000000)

Number of trial against decision to refuse ()

Date of requesting trial against decision to refuse ()

공개특허특2001-0051095

(19)대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)(51) Int. Cl. 6
C12N 15/29(11) 공개번호 특2001-0051095
(43) 공개일자 2001년06월25일(21) 출원번호 10-2000-0061231
(22) 출원일자 2000년10월18일(30) 우선권주장 10199900473611999년10월29일대한민국(KR)
(71) 출원인 한국생명공학연구원 복성해
대전 유성구 어은동 52번지
(72) 발명자 곽상수
대전광역시유성구전민동464-1엑스포아파트307동306호
이행순
대전광역시유성구어은동한빛아파트126동502호
권석윤
대전광역시유성구어은동99한빛아파트102동1802호
김기연
대전광역시중구충촌동현대아파트106동504호
(74) 대리인 이원희

심사청구 : 없음

(54) 고구마 유래 퍼옥시다제 게놈 유전자 및 그의 프로모터

요약

본 발명은 스트레스 유도성 프로모터 (stress inducible promoter)에 관한 것으로서, 구체적으로 고구마 (Ipomoea batatas) 식물체에서 유도된 배양세포로부터 환경 스트레스 조건에서 강하게 발현이 유도되는 고구마의 퍼옥시다제 (peroxidase, POD)를 암호하는 신규 유전자 및 그의 프로모터에 관한 것이다. 본 발명의 퍼옥시다제 유전자 프로모터의 전체 또는 일부는 세포, 식물체, 미생물 및 박테리아 등의 형질전환체 개발에 이용되어 환경 스트레스에 대해 내성을 가지는 내성식물체 개발과 유용성분을 대량으로 생산할 수 있는 형질전환 생물체 개발에 유용하게 이용될 수 있다.

대표도

도3

명세서

<110> Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology
<120> A peroxidase genomic gene derived from Ipomoea batatas and a promoter thereof
<130> Op-09-48
<160> 4
<170> KopatentIn 1.55

<210> 1
<211> 3741
<212> DNA
<213> Ipomoea batatas
<220>

<221> CDS

<222> (1829)..(2155)

<223> exon I

<220>

<221> CDS

<222> (2898)..(3092)

<223> exon II

<220>

<221> CDS

<222> (3190)..(3741)

<223> exon III

<400> 1

```

ttaatttcaa tatattgict gtaatttttt ttagtacta ctcatgtcaa atcctgttac 60
atataaaata tgttcaaatt cactgaaact caaatctata acctcttatt tgatagagtc 120
actctataca actagaccac ggaattgtca actagaccac ggaattgtta gcttgtttat 180
tgtattcacg tataattttg atgaatatca tcaactttga cgggcaaaat agatagcatg 240
tggcggccac agtttcaaaa ttcatacaag atgtcaaggg gaccggcccg gtggctgcgt 300
gcataacacg tgcaagattt gtgaaattct ttctagattc cttttatcct ttttctctt 360
cttgaaaaaa tagaaacaga aattatatgt aaataaaata ataataatat gggttccata 420
ctctatagca tatcatatgg tgcattgcac atatttcac gacaaagaaa gccacggtgc 480
agacgctcga ttttgacatt ttacaactta caaggccatg atcagatcga taataccaaa 540
tggfaccacc taactagggtg atatatatta tgtatgtcat tattttaaac tgtattacaa 600
agactatatt ttcatlaatt ggtacaaaga aaaattaaac agaaaagaaa ggaaaaaatg 660
actcaccacc tagcacctag acacctagac accaagtacc caaacctctt attttcaaca 720
tclattttca gatgtaaata tgagtggac gaagaagggtg ttagcaatta ttgattaat 780
cttgctacga taattatgat ccactcactt agtcattttt ttcagaccaa gacaactagc 840
ttgagttttt tattgtatgt ggtcggaaacg tttttgtaa ttaaaaaaat aaaagttgca 900
tcattatata tggtagatta agtaattgat caatcaacgt ttaattttgc atttatcggc 960
aagggtggagg ttcaacttc cagtcgaact tagagagtc tggagacct tgaccagtta 1020
actagcgggtg tcgaaaacct gcacaacttg agatttaatt gcataccttt tatatatgac 1080
gcgttttatt ttttttct agaaaataat ttggaagaaa ataagaatat gtattctgtg 1140
aaagctaggc caaaacgaat gtcttttcgt cgttttcgtt aaaggtttag atcatatttc 1200
atctggicca acactcaaac ttgtataatg gacgaattat tagtcatttt agacctaccg 1260
gctagcgcgga cttttttgt ttccataaag atcgataat tgcattggcca gatgcaaagt 1320
ttgaaattta atgtttgcca aatcctatca tacaccacaa cacatgtctc agggccaagt 1380
ggcaccagca aacattcctg tcataattaa tttttttaat gagaaggagg aaactcacag 1440
clattactcg aaggatatata atattgagta aatcttactt tgtatttcta gttgacaaaa 1500
caccgcaaga taaactatac taagtcaaaa tcacctcacc ggggtggctc agattggttt 1560
ttcaatata agaggggggtg tgaactcccg tgccgacctc ttttgagggg caataatgta 1620
cggtcacgcc aaccaagctt gatttttnt gacaaatata ttactacata tattacacgg 1680
tcaaataatt aatcaaaaaa taaaaaaga cccaattaa agtccccaac cactctcaaa 1740
tattctattt aagggaacc ttgagggcaa ttcattgcac ctcaaccctt tcttctcat 1800

```

tttcttaatc ttacattttc ctttgacc atg gct tcc att gtg agt cgg ctc 1852

Met Ala Ser Ile Val Ser Arg Leu

1 5

agt ctt gcg cta agc ctc ata gct cta gct cta gct ggc tac tcc att 1900

Ser Leu Ala Leu Ser Leu Ile Ala Leu Ala Leu Ala Gly Tyr Ser Ile

10 15 20

tac cag cac aca cag tca gcc atg gag agc cag ccc atc aag gct ctc 1948

Tyr Gln His Thr Gln Ser Ala Met Glu Ser Gln Pro Ile Lys Ala Leu

25 30 35 40

ccg gcg tgg cta cag ctc ccc acg ttc caa tct gcc aac gtg tta tcg 1996

Pro Ala Trp Leu Gln Leu Pro Thr Phe Gln Ser Ala Asn Val Leu Ser

45 50 55

tat tat ccg agt ggc cgc aaa tcc tcc ccc gcc ggc atg ctt tcc gac 2044

Tyr Tyr Pro Ser Gly Arg Lys Ser Ser Pro Ala Gly Met Leu Ser Asp

60 65 70

gaa gct tgc gtg ttc tcc gcc gtt aaa gaa gtt gtc gac gcc gcc atc 2092

Glu Ala Cys Val Phe Ser Ala Val Lys Glu Val Val Asp Ala Ala Ile

75 80 85

gat aac gaa act cgc atg ggg gct tcc ctc att cgt ctc ttc cac 2140

Asp Asn Glu Thr Arg Met Gly Ala Ser Leu Ile Arg Leu Phe Phe His

90 95 100

gat tgc ttt gtc gat gtacg tatagtatac atataattat gtaaaccta 2190

Asp Cys Phe Val Asp

105

tatatatata tatatatata tatatacatg cacaaaaagt ttataatact aatatatacc 2250

catacttttt gcatacatt atatatatta acacgattat attaaaaacc aataatatat 2310

tatatatata tatatagtta actatctttt ctttcacttt cttatcactt tttaaattgt 2370

taaatctaaa aattaattgt tattttattg aatttttct attttctatt ttgtttaaag 2430

acttaattat actatttttt aactgggctg gtaactttcc gtcaatatgt ttattttaac 2490

aattglaaca attaaaacca attgtaacaa tagtacgtaa aagatcaaag tgacataaac 2550

cagcttaagt tttttaaatg gacgaactca aaacaaaaaa gtcaatatgt aatttcggta 2610

gagaagtcaa atttaaaatt tcatagtat caaatcaatt gttttatcaa cccagctagg 2670

ttgnctattt caaaaactaa ttagacattg gtgtgcatga aacattacgt taaaacaaaa 2730

gtcatcacc accctgctt ataattgggt tacctaagtt atcacacgtt cctgtcgaac 2790

ttacagccca aacatgtcaa tatgtcaaat gctttaatga aaaatattat tagattatta 2850

tttatctaact actaaatttt cttcttcgta aaaatttggt tgtatta ggt tgt gat 2906

Gly Cys Asp

1

gca ggg ctt ctt ttg aat gat acg gcg acg ttc aca ggg gaa caa act 2954

Ala Gly Leu Leu Leu Asn Asp Thr Ala Thr Phe Thr Gly Glu Gln Thr

5 10 15

gca ttt ggc aat ctt aat tcc gtg aga ggg ttt gag gtt ata gaa caa 3002

Ala Phe Gly Asn Leu Asn Ser Val Arg Gly Phe Glu Val Ile Glu Gln

20 25 30 35

gct aaa cag aat gca gta gct aaa tgt gcc gat aca ccc gta tct tgt 3050
Ala Lys Gln Asn Ala Val Ala Lys Cys Ala Asp Thr Pro Val Ser Cys
40 45 50

gct gac att tta tct att gct gct cgt gat tct ttc gaa cgg gtaagtct 3100
Ala Asp Ile Leu Ser Ile Ala Ala Arg Asp Ser Phe Glu Arg
55 60 65

tcaatatcgt gtataagtgt tactaataat gtcaatatgt tacatgtaga catgtattta 3160
tttattttct ttgtatttac attcaacag ttt agt gga gca aca tac act gtg 3213
Phe Ser Gly Ala Thr Tyr Thr Val
1 5

act tta ggg cga ctc gat gcg aga acc gcg aac tta acc gga gct aat 3261
Thr Leu Gly Arg Leu Asp Ala Arg Thr Ala Asn Leu Thr Gly Ala Asn
10 15 20

acc cag ctt gtc gga cca tcg gaa aac ttg act gaa caa gtc agg aaa 3309
Thr Gln Leu Val Gly Pro Ser Glu Asn Leu Thr Glu Gln Val Arg Lys
25 30 35 40

ttt ggc atc aaa gga ttt aac gag agg gaa ttg gtc gcc ttg ttg ggt 3357
Phe Gly Ile Lys Gly Phe Asn Glu Arg Glu Leu Val Ala Leu Leu Gly
45 50 55

tca cac acg cta ggg ttt gcc aga tgt ccg gtt tta tgt gac aac aga 3405
Ser His Thr Leu Gly Phe Ala Arg Cys Pro Val Leu Cys Asp Asn Arg
60 65 70

aac att aac ccg gtt cgg gtc ccc ggt ctg caa tgc aac tgt cct gta 3453
Asn Ile Asn Pro Val Arg Val Pro Gly Leu Gln Cys Asn Cys Pro Val
75 80 85

act aat act gac ccg ggt ttg gtc ggg ctg gac ccc aca ccc gat aca 3501
Thr Asn Thr Asp Pro Gly Leu Val Gly Leu Asp Pro Thr Pro Asp Thr
90 95 100

ttc gac caa cgt tat tac tct gac cta gtc agc ggc caa ggc ctc ctg 3549
Phe Asp Gln Arg Tyr Tyr Ser Asp Leu Val Ser Gly Gln Gly Leu Leu
105 110 115 120

ttt tcc gac caa cag ctg atg aac agc acc acc acc agc gac gcc gtg 3597
Phe Ser Asp Gln Gln Leu Met Asn Ser Thr Thr Thr Ser Asp Ala Val
125 130 135

acg acg tac cgt gac tcc ata gac acc ttc ctt gcc gac ttc gcc gcc 3645
Thr Thr Tyr Arg Asp Ser Ile Asp Thr Phe Leu Ala Asp Phe Ala Ala
140 145 150

gcc atg gtc aag atg agc aac ctg cct ccg tcc gcc gga gtt gag ctc 3693
Ala Met Val Lys Met Ser Asn Leu Pro Pro Ser Ala Gly Val Glu Leu
155 160 165

gaa atc cgt gac gtc tgc agc cgg gtg aat gac gtc tct gtt gca tcc 3741
Glu Ile Arg Asp Val Cys Ser Arg Val Asn Asp Val Ser Val Ala Ser
170 175 180

<210> 2

<211> 1828

<212> DNA

<213> Imopoea batatas

<400> 2

ttaatttcaa tattttgtct gtatttttt tttagtacta ctcatgtcaa atcctgttac 60
 atataaaata tgttcaaatt cactgaaact caaatctata acctcttatt tgatagagtc 120
 actctataca actagaccac ggaattgtca actagaccac ggaattgtta gcttgtttat 180
 tgtattcacg tataattttg atgaatatca tcaactttga cgggcaaaa agatagcatg 240
 tggcgggccac agtttcaaaa ttcatacaag atgtcaaggg gaccggcccg gtggctgcgt 300
 gcatatcacg tgcaagattt gtgaaattct ttctagattc cttttatcct tttcttctt 360
 ctgaaaaaa tagaaacaga aattatatgt aaataaaata ataataat ggtttccata 420
 ctctatagca tatcatatgg tgcattgcac atatttcac gacaaagaaa gccacgggtc 480
 agacgctcga tttgacatt ttacaactta caaggccatg atcagatcga taataccaaa 540
 tggtagcacc taactagggtg atatatatta tgtatgtcat tattttaaac tgtattacaa 600
 agactatttt ttcatlaatt ggtacaaaga aaaattaaac agaaaagaaa ggaaaaaatg 660
 actcaccacc tagcacctag acacctagac accaagtacc caaacctct atttcaaca 720
 tctattttca gatgtaaata tgagttggac gaagaagggtg ttagcaatta ttgattaat 780
 ctgctacga taattatgat ccactcactt agtcatttt tttagacca gacaactagc 840
 ttgagtttt tattgtatgt ggtcggacg tttttgtta ttaaaaaaat aaaagttgca 900
 tcattatata tggtagatta agtaattgat caatcaacgt ttaattttgc atttatcggc 960
 aagggtggagg ttcaacttc cagtcgaact tagagagtca ttggagacct tgaccagtta 1020
 actagcgggtg tcgaaaacct gcacaacttg agatttaatt gcataccttt tatatatgac 1080
 gcgttttatt ttttttct agaaaaaat ttggaagaaa ataagaatat gtattctgtg 1140
 aaagctaggc caaacgaat gtcctttcgt cgttttcgtt aaaggtttag atcatatttc 1200
 atctggcca acactcaaac ttgtataatg gacgaattat tagtcatttt agacctaccg 1260
 gctagcgcga ctttttgt ttccataaag attcgataat tgcattggcca gatgcaaagt 1320
 ttgaaattta atgtttgcca aatcctatca tacaccacaa cacatgtctc agggccaagt 1380
 ggcaccagca aacattcctg tcataattaa tttttttaa gagaaggagg aaactcacag 1440
 ctattactcg aaggatatata atattgagta aatcttactt tgtgattcta gttgacaaaa 1500
 caccgcaaga taaactatac taagttcaaa tcacctcacc gggttggctc agattggttt 1560
 ttcaatata agaggggggtg tgaactccc tgccgacctc ttttagggga caataatgta 1620
 cggtcacgcc aaccaagctt gatttttnt gacaaatata ttactacata tattacacgg 1680
 tcaataatt aatcaaaaaa taaaaaaga cccaattaa agtccccaac cactctcaaa 1740
 tattctattt aagggaacc tttagggcaa ttcatgcac ctcaaccct tcttctcat 1800
 tttctaatc ttacatttc ctttgacc 1828

<210> 3

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> forward primer 1

<400> 3

acgcgtcgac cttactttgt gattcta 27

<210> 4

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> forward primer 2

<400> 4

acgcgtcgac aatggacgaa ttattagt 28

<210> 5

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> forward primer 3

<400> 5

acgcgtcgac ggtcggaacg tttttt 26

<210> 6

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> forward primer 4

<400> 6

acgcgtcgac ccatgatcag atcgata 27

<210> 7

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> forward primer 5

<400> 7

acgcgtcgac aatattttgt ctgtatt 27

<210> 8

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> reverse primer 1

<400> 8

cgggatccgg tcaaaggaaa at 22

<210> 9

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> NPTII primer 1

<400> 9

gaggctattc ggctagatg 19

<210> 10

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> NPTII primer 2

<400> 10

atcgggagcg gcgataccgt a 21

<210> 11

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> promoter primer 1

<400> 11

ccattgatca gatcgata 18

<210> 12

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> promoter primer 2

<400> 12

ggtcaaagga aaatgtaag 19

도면의 간단한 설명

도 1은 본 발명의, 고구마의 퍼옥시다제 유전자 swpa2를 포함하는 게놈 DNA를 분리하기 위하여 서던블롯 (southern blot)으로 분석한 결과를 나타낸 것이고, 도 2a는 본 발명의, 고구마의 퍼옥시다제를 코딩하는 게놈 유전자 SWPA2의 염기서열과 이로부터 번역된 아미노산 서열을 나타낸 것이고, 도 2b는 도 2a의 퍼옥시다제를 코딩하는 게놈 유전자 SWPA2의 염기서열과 이로부터 번역된 아미노산 서열이 계속되는 것이고, 도 3은 고구마 퍼옥시다제를 코딩하는 게놈 유전자 SWPA2의 프로모터 영역의 염기서열을 나타낸 것이고, 도 4는 본 발명의 퍼옥시다제를 코딩하는 게놈 유전자 SWPA2의 프로모터 영역의 결실 돌연변이체를 제조하는 과정을 나타내는 모식도이고, 도 5는 본 발명의 프로모터 영역의 결실 돌연변이체를 이용한 transit assay 결과를 나타낸 것이고, 도 6은 본 발명의 프로모터 결실 돌연변이체가 도입된 형질전환 효모에서 GUS 활성을 측정한 결과이고, 도 7a는 본 발명의 프로모터 결실 돌연변이체가 도입된 담배의 형질전환 식물체에서 상처를 처리하지 않고 유도된 GUS 활성을 측정한 결과이고, 도 7b는 본 발명의 프로모터 결실 돌연변이체가 도입된 담배의 형질전환 식물체에서 상처를 처리한 후 유도된 GUS 활성을 측정한 결과이고, 도 8a는 본 발명의 프로모터 결실 돌연변이체가 도입된 담배의 형질전환 식물체에서 H₂O₂를 처리하지 않고 유도된 GUS 활성을 측정한 결과이고, 도 8b는 본 발명의 프로모터 결실 돌연변이체가 도입된 담배의 형질전환 식물체에서 H₂O₂를 처리한 후 유도된 GUS 활성을 측정한 결과이고, 도 9a는 본 발명의 프로모터 결실 돌연변이체가 도입된 담배의 형질전환 식물체에서 자외선을 조사하지 않고 유도된 GUS 활성을 측정한 결과이고, 도 9b는 본 발명의 프로모터 결실 돌연변이체가 도입된 담배의 형질전환 식물체에서 자외선을 조사한 후 유도된 GUS 활성을 측정한 결과이고, 도 10a는 본 발명의 프로모터 결실 돌연변이체가 도입된 담배의 형질전환 식물체의 잎으로부터 유도된 캘러스를 GUS로 염색한 결과를 나타낸 것이고, A; pBS1314 B; pBS1824C; 대조군 D; pBI121도 10b는 본 발명의 프로모터 결실 돌연변이체가 도입된 담배의 형질전환 식물체의 잎으로부터 유도된 캘러스의 GUS 활성을 측정한 결과이고, A; pBS1314 B; pBS1824C; 대조군 D; pBI121도 11a는 본 발명의 프로모터 결실 돌연변이체가 도입된 담배의 형질전환 식물체의 잎으로부터 유도된 캘러스를 현탁배양하여 그 세포의 세포생장 곡선을 나타낸 것이고, 도 11b는 본 발명의 프로모터 결실 돌연변이체가 도입된 담배의 형질전환 식물체의 잎으로부터 유도된 캘러스를 현탁배양하여 그 세포의 GUS 활성을 측정한 결과이다.

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야 종래기술

본 발명은 신규한 프로모터 및 퍼옥시다제 유전자에 관한 것이다.

식물을 포함한 대부분의 생물은 병균, 해충, 바이러스 등의 생물학적 스트레스 뿐만 아니라 지구 환경 악화에 따라 생기는 각종 환경 스트레스를 받게 되면 생명유지에 필요한 필수 원소이지만 반응성이 높은 산소가 심각한 생리적인 장애 등을 유발하는 슈퍼옥사이드 음이온 라디칼 (superoxide anion radical, O_2^-), 과산화수소 (hydrogen peroxide, H_2O_2), 수산화 라디칼 (hydroxyl radical) 등의 활성산소종 (reactive oxygen species; ROS)으로 변하게 된다. 따라서 생체 내에는 이러한 활성 산소를 제거하는 시스템으로 슈퍼옥사이드 디스무타제 (SOD: EC 1.15.1.1), 퍼옥시다제 (peroxidase, 이하 "POD"라 약칭함), 카탈라제 (catalase, CAT) 등의 고분자 항산화 효소와 비타민 C, 비타민 E, 글루타치온 (glutathion) 등의 항산화 물질 등이 많이 존재하게 된다.

퍼옥시다제는 전자공여체의 존재하에 과산화수소를 환원시키는 효소로서 식물세포에 광범위하게 존재하는 것으로 알려져 있다. 퍼옥시다제는 효소반응이 민감하기 때문에 각종 임상시험용 시약으로 이용되는 등 상업적으로 중요한 효소일 뿐 아니라, 식물체가 각종 외부적 스트레스에 반응하는데 중요한 역할을 하기 때문에 많은 관심의 대상이 되고 있다. 일반적으로 식물 퍼옥시다제는 각종 환경 스트레스에 의해 그 활성이 증가되며, 특히 식물 배양세포는 높은 산화적 스트레스에서 배양되기 때문에 퍼옥시다제 활성이 매우 높다. 그 중에서도 고구마 배양세포는 지금까지 보고된 어느 식물체의 배양세포보다도 퍼옥시다제를 대량으로 생산한다는 것이 보고되었다 (Phytochemistry, 39, 981-984, 1995).

현재까지 서양겨자무, 보리, 밀, 유채, 애기장대풀, 담배, 시금치, 벼 등 약 20종의 식물로부터 유래된 일부 식물의 퍼옥시다제 동위효소를 코딩하는 유전자가 알려져 있다. 고구마의 퍼옥시다제 유전자에 대해서는 본 발명자들에 의해 처음으로 분리되어 보고되었는데, 고구마 배양세포로부터 분리된 산성 퍼옥시다제 swpa1 및 중성 퍼옥시다제 swpn1 유전자가 고구마 배양세포와 식물체 줄기에서 특이적으로 발현하며 게놈 내에 복수로 존재하는 특징이 있고 이의 전체 또는 일부를 세포, 식물체에 형질전환시킴으로써 퍼옥시다제를 안정적으로 대량생산할 수 있음을 보고하였다 (Mol. Gen. Genet., 255, 382-391, 1997).

또한, 본 발명자들은 고구마로부터 산성 퍼옥시다제 유전자 swpa2 (GeneBank Accession No. AF109124) 및 swpa3 cDNA (GeneBank Accession No. AF109123)를 분리하여 그 염기서열을 밝힌 바 있다. 이에 의하면, swpa2는 71개의 분비 펩티드 (signal peptide)를 가지고 있고 swpa3는 66개의 분비 펩티드를 가지고 있으며, swpa2와 swpa3는 각각 358개와 349개의 아미노산을 코딩하는 1246 bp와 1310 bp 크기의 염기서열을 갖는다. swpa2와 swpa3에 의해 발현되는 성숙 단백질의 등전점 (isoelectric point)은 각각 4.1과 4.3으로 이는 상기 유전자 모두가 산성 퍼옥시다제를 암호함을 나타낸다. 이들의 3'-말단 비번역영역 (untranslated region)에는 전형적인 폴리아데닐화 신호 (polyadenylation signal)인 AAUAAA와 poly(A)-꼬리 (poly(A)-tail)가 존재하는데, 특히 swpa2 유전자의 N-말단서열은 고구마 배양세포의 주성분 동위효소 (A-2)와 완전히 일치하였다. 또한, 본 발명자들은 swpa2 유전자는 고구마 식물체 잎에 상처를 내거나 저온 처리 또는 오존처리를 한 경우에는 강하게 발현이 유도된 반면, swpa3 유전자는 식물체 잎에 상처를 준 경우에는 약하게 발현되었지만 저온처리 또는 오존처리를 한 경우에는 강하게 발현됨을 밝혔다 (Mol. Gen. Genet., 261, 941-947, 1999).

발명이 이루고자하는 기술적 과제

본 발명의 목적은 고구마에서 유래된 퍼옥시다제의 게놈 DNA 및 그의 염기서열을 제공하는 것이다.

본 발명의 또 다른 목적은 다양한 환경 스트레스에 의해 유전자의 발현이 강하게 유도되는 프로모터를 제공하는 것이다.

본 발명의 또 다른 목적은 다양한 환경 스트레스에 대해 내성을 가지는 형질전환체 및 그의 제조방법을 제공하는 것이다.

본 발명의 또 다른 목적은 유용성분을 대량으로 생산할 수 있는 형질전환체 및 그의 제조방법을 제공하는 것이다.

발명의 구성 및 작용

본 명세서에 기재된 용어, 기술 등은 특별한 한정이 없는 한, 본 발명이 속하는 기술 분야에서 일반적으로 사용되는 의미로 사용된다. 또한, 본 명세서에 언급된 문헌들은 모두 본 발명을 설명하기 위한 문헌으로 본 명세서에 포함된다.

본 발명에서 "염기 서열의 변이체"는 생물학적 활성을 유지하면서 swpa2, SWPA2, 또는 SWPA2 프로모터의 염기서열에 하나 이상의 염기가 치환, 결실 또는 부가되어 변경된 염기서열을 의미한다.

"단백질의 변이체"는 swpa2에 의해 코딩되는 퍼옥시다제 활성을 가지며, swpa2에 의해 코딩되는 아미노산 서열 중 하나 이상의 아미노산이 치환, 결실 또는 부가되어 변경된 아미노산 서열을 의미한다.

"SWPA2 프로모터"는 서열번호 1의 1 내지 1314번 위치의 염기서열을 포함하며, 작동가능하게 연결된 유전자에 적절한 조건하에서 전사활성을 부여하는 염기서열을 의미한다.

"SWPA2 프로모터의 활성단편"은 서열번호 1의 1 내지 1824번 위치의 염기 서열 중 일부를 포함하며, 작동가능하게 연결된 유전자에 SWPA2 프로모터 활성을 부여하는 염기서열을 의미한다.

"형질전환체"는 SWPA2 프로모터와 이것과 작동가능하게 연결되며 유용물질을 코딩하는 DNA 서열로 이루어지는 DNA 구조물(DNA construct)에 의해 형질전환된 세포 또는 식물체를 의미한다. 본 발명에서 형질전환체는 형질전환된 미생물, 동물세포, 식물세포, 형질전환된 동물 또는 식물체 및 이들로부터 유래된 배양세포 등을 포함한다.

"환경 스트레스"는 대상 생물에 스트레스로 작용하는 생물적 또는 미생물적 스트레스를 의미하며, 예를 들어 상처, 활성 산소종, 열, 수분, 온도, 염, 대기오염, 자외선, 중금속 등에 의한 스트레스를 의미한다.

이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

본 발명은 고구마 유래 퍼옥시다제 유전자를 코딩하는 게놈 유전자 SWPA2 및 그의 염기서열을 제공한다.

본 발명의 SWPA2는 서열번호 1로 기재되는 염기서열 전체 또는 그것의 일부로 이루어지며 고구마 퍼옥시다제 swpa2를 코딩하는 엑손을 포함하는 DNA 서열이다.

상기 SWPA2는 고구마 게놈 DNA 라이브러리로부터 3차 스크리닝을 통해 swpa2와 판독구조 (ORF; Open Reading Frame)가 동일한 게놈 클론으로 선별되었으며 이를 천연 SWPA2라 명명하였다 (도 2 참조).

천연 SWPA2는 3개의 엑손과 2개의 인트론 및 프로모터 영역으로 이루어져 있는데, 상기 엑손의 염기서열은 swpa2 cDNA (GeneBank Accession No. AF109124)의 염기서열과 완전히 일치하였다. 고구마 퍼옥시다제 게놈 클론은 2개의 인트론 중 특히 첫 번째 인트론이 737 bp로 다른 식물종이 100 내지 300 bp인 것에 비해 상당히 긴 인트론을 포함하고 있으며, 각각의 인트론은 5'쪽이 GT로 시작하고 3'쪽이 AG로 끝나는 GT-AG의 법칙을 따르고 있다.

또한, 본 발명은 다양한 환경 스트레스에 의해 유전자의 발현이 유도되는 프로모터를 제공한다.

본 명세서에서 특별히 한정이 없는 한 SWPA2 프로모터는 SWPA2 프로모터 및 그것의 활성 단편을 포함하는 의미로 사용된다.

본 발명에서 SWPA2 프로모터는 서열번호 2로 기재되는 염기서열 전체 또는 그것의 일부로 이루어지며, 프로모터 활성을 나타내는 DNA 서열로 이루어진다. 한 예로, 본 발명에서 SWPA2 프로모터는 바람직하게는 서열번호 2의 염기서열 중 1 내지 1314번 또는 그것의 일부로 이루어지며, 프로모터 활성을 나타내는 DNA 서열로 이루어진다.

본 발명에 따른 프로모터는 환경 스트레스에 의해 강하게 발현되며, 고구마 유래 퍼옥시다제 게놈 유전자의 천연 SWPA2로부터 유래된다.

천연 SWPA2는 번역개시점의 상류에 프로모터 영역을 가지고 있는데, 이를 SWPA2 프로모터라 명명하였다. SWPA2 프로모터 영역을 Computational Biology & Informatics Laboratory의 Transcription Element Search Software (TESS)를 이용하여 염기서열 상의 특성을 분석한 결과, 상기 서열번호 2로 기재되는 염기서열로 이루어지며 전사개시를 위한 TATA box와 -895 위치에 CAAT box를 가진다 (도 3 참조).

전사조절 단백질의 부착부위로서, ABA, 메틸 자스모네이트 (methyl jasmonate), 자외선, 상처, 저산소증 등에 의해 조절되는 것으로 알려져 있는 (Williams, M. et al., 1992) G box는 NNNSACGTGNCM으로 기재되는 아미노산 서열을 가지는데 SWPA2 프로모터 영역의 -445와 -455 위치에 이와 유사한 영역 (motif)이 존재한다 (도 3 참조). 천연 SWPA2의 프로모터 영역 내의 G box와 전사개시점 사이에는 조직 특이적으로 발현되며 스트레스에 의해 발현이 유도되는 전사인자 (transcription factor)로 밝혀진 (Gidoni, D. et al., 1984) SP-1이 존재하고 있으며, 그 외에도 AAAATAA의 반복서열 (repeat sequence)이 6개 존재한다.

또한, 천연 SWPA2의 프로모터 영역은 서열번호 2의 염기서열 내 -1170와 -1188 사이에 AGAAN인 보존적 서열 (consensus sequence)을 가지는 열충격에 반응하는 전사인자인 HSE (heat shock element)를 가지고 있다 (도 3 참조). GCN-4와 AP-1은 활성산소종 등에 반응하는 것으로 알려져 있으며, 특히 AP-1은 보리 C-hordein 프로모터에서 질소에 반응하는 중요 요소로 알려져 있다 (Muller, M. et al., 1993). 아울러, 천연 SWPA2의 프로모터 영역에는 GCN-4가 세 부위에, AP-1이 두 부위에 존재한다. 특히, -1175와 -1163 사이에는 GCN-4와 AP-1이 역반복서열 (inverted repeat sequence)로 존재한다 (도 3 참조).

본 발명의 SWPA2 프로모터는 산화적 스트레스를 포함한 다양한 외부적 요인에 의해 발현이 강하게 유도되고 특히, 배양 세포에서 강하게 발현되므로 환경 스트레스 저항성 식물체의 개발과 형질전환 식물세포를 이용한 유용물질 생산에 유용하게 이용될 수 있다.

본 발명의 SWPA2 프로모터는 스트레스에 의해 유전자의 발현을 효과적으로 유도할 수 있다. 이를 위하여 본 발명의 프로모터는 ABA, 메틸 자스모네이트, 상처, 저산소증, 활성산소종, 열 또는 질소에 의한 스트레스를 인식하는 인자들을 포함한다. SWPA2 프로모터는 이러한 특성을 이용하여 서열번호 2로 기재되는 염기서열 중 1 내지 1824번 또는 그것의 일부로 이루어지며, 프로모터 활성을 나타내는 DNA 서열 및 이것과 작동가능하도록 연결된 구조 유전자로 이루어지는 융합 유전자 구조물의 제조에 이용될 수 있다. 상기 융합 유전자 구조물은 SWPA2 프로모터 유전자에 유용물질의 생산과 관련된 구조 유전자를 연결하여 다양한 환경 스트레스하에서 SWPA2 프로모터의 조절에 의해 유용물질을 발현하므로 유용물질 생산을 위한 형질전환체의 제조에 유용하게 이용될 수 있다. 또한, 상기 융합 유전자 구조물에 다양한 환경 스트레스에 대해 내성을 나타내는 유전자를 구조 유전자로 사용하게 되면 외부적인 스트레스가 가해질 경우 이에 대해 내성을 가지는 형질전환체의 제조에도 이용될 수 있다.

본 발명의 프로모터는 식물체 뿐 아니라 미생물에서도 작용가능하며, 따라서 형질전환 식물세포, 형질전환 식물체 및 이로부터 유래된 형질전환 캘러스, 형질전환 미생물, 형질전환 동물세포를 얻는데 이용될 수 있다.

아울러, 본 발명은 상기 SWPA2 프로모터를 이용하여 다양한 환경 스트레스에 의해 유용물질의 생산을 유도할 수 있는 형질전환체의 제조방법을 제공한다.

상기 형질전환체의 제조방법은 1) 서열번호 2의 염기서열 중 1 내지 1824번 또는 그것의 일부로 이루어지며, 프로모터 활성을 나타내는 DNA 서열과 이것과 작동가능하게 연결되며 유용물질을 코딩하는 DNA 서열로 이루어지는 발현벡터를 제조하는 단계; 2) 숙주세포에 상기 발현벡터를 도입하는 단계; 및 3) 상기 발현벡터가 도입된 형질전환체를 선별하는 단계로 이루어진다.

본 발명의 방법에서 유용물질은 약리효과를 발휘하는 다양한 단백질이나 펩타이드, 형질전환체에 스트레스에 대한 내성을 부여하는 물질 등을 포함한다. 따라서 본 발명의 방법에 의해 유용물질을 생산할 수 있는 형질전환체 및 다양한 환경 스트레스에 내성이 있는 형질전환체를 제조할 수 있다.

이하, 본 발명을 하기 실시예에 의거하여 좀더 상세하게 설명하고자 한다. 단 하기 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐, 본 발명의 범위가 실시예에 의해 제한되는 것은 아니다.

〈실시예 1〉 퍼옥시다제 게놈 DNA 분석 퍼옥시다제 유전자 swpa2의 게놈 유전자를 찾기 위하여, 먼저 swpa2 (GeneBank Accession No. AF109124)가 고구마의 게놈 내에 존재하는 유전자임을 확인하고자 서던블롯 분석 (Southern blot analysis)을 실시하였다. 고구마 배양세포로부터 델라포르타의 방법 (Dellaporta, Newsletter, 57, 26-29, 1983)에 따라 추출한 게놈 DNA 15 μ g를 제한효소 EcoRI, HincII 및 HindIII로 절단하여 아가로즈 겔에 전기영동을 수행하였다. 상기 겔상의 게놈 DNA를 나일론 막에 전사한 후 swpa2 유전자 각각의 특이적인 3'-말단 비번역 영역을

³²P로 표지한 유전자 단편을 탐침으로 사용하여 혼성화 반응을 수행하였으며 그 결과를 도 1에 나타내었다.

도 1에 나타난 바와 같이, swpa2 유전자는 2개 이상의 밴드를 나타내어 서로 다른 게놈 내에 복수로 존재하는 유전자임을 알 수 있다.

〈실시예 2〉 퍼옥시다제 게놈 DNA SWPA2의 분리 및 염기서열 분석 본 발명의 퍼옥시다제 유전자 swpa2를 게놈 내에 포함하는 게놈 DNA를 분리하기 위하여 하기와 같은 실험을 수행하였다.

고구마 게놈 DNA 라이브러리는 λ Blue STARTM BamHI Arms vector kit (Novagen사)를 이용하여 제조하였다. swpa2의 염기서열을 특이적으로 인식하는 프라이머 (primer)를 사용하여 PCR을 수행하였다. 이로부터 합성된 0.5 kb 크기의 DNA 산물을

³²P로 표지하여 고구마 POD 게놈 DNA 라이브러리의 스크리닝에 이용하였다. 라이브러리 스크리닝은 Sambrook 등 (Molecular cloning: a laboratory manual 2ed. 1989)의 방법에 따라 실시하였으며, 3차 스크리닝을 통해 swpa2와 ORF

가 동일한 게놈 클론을 얻었고 이를 천연 SWPA2라 명명하였다.

천연 SWPA2는 전체 길이가 약 4 kb 정도인 서열번호 1로 기재되는 염기서열을 가지며 3개의 엑손과 2개의 인트론 및 프로모터 영역으로 구성되어 있었다 (도 2). 상기 엑손의 염기서열은 swpa2 cDNA의 염기서열과 완전히 일치하는 게놈 클론임을 확인하였다. 고구마 POD 게놈 클론은 2개의 인트론 중 특히 첫 번째 인트론이 737 bp로 다른 식물종이 100 내지 300 bp인 것에 비해 상당히 긴 인트론을 포함하고 있으며, 각각의 인트론은 5'쪽이 GT로 시작하고 3'쪽이 AG로 끝나는 GT-AG의 법칙을 따르고 있었다.

〈실시예 3〉 퍼옥시다제 게놈 DNA SWPA2의 프로모터 분석천연 SWPA2의 프로모터는 번역개시점의 상류로부터 -1824 bp까지의 영역에 해당하는 서열번호 2로 기재되는 염기서열로 구성된다 (도 3). 상기 SWPA2 프로모터의 염기서열상의 특성을 Computational Biology & Informatics Laboratory의 Transcription Element Search Software (TESS)를 이용하여 분석하였다.

염기서열 분석 결과, SWPA2 프로모터는 진핵생물 프로모터의 조절요소 (regulatory elements) 부위를 갖고 있음이 확인되었는데, 전사개시를 위한 TATA box가 존재하였으며 -895 위치에 CAAT box가 존재하였다. 전사조절 단백질의 부착부위로서 ABA, 메틸 자스모네이트 (methyl jasmonate), 자외선 (UV light), 상처 (wounding), 저산소증 (hypoxia) 등에 의해 조절되는 것으로 알려져 있는 (Williams, M. et al., 1992) G box는 NNNSACGTGNCM으로 기재되는 아미노산 서열을 가지는데 SWPA2 프로모터의 -445와 -455 위치에 이와 유사한 영역 (motif)이 존재하였다 (도 3). SWPA2 프로모터 내의 G box와 전사개시점 사이에는 조직 특이적으로 발현되며 스트레스에 의해 발현이 유도되는 전사인자 (transcription factor)로 밝혀진 (Gidoni, D. et al., 1984) SP-1이 존재하고 있으며, 그 외에도 AAAATAA의 반복서열 (repeat sequence)이 6개 존재하였다.

또한, SWPA2 프로모터는 -1170와 -1188 사이에 AGAAN인 보존적 서열 (consensus sequence)을 가지는 열충격에 반응하는 전사인자인 HSE (heat shock element)를 가지고 있었다 (도 3). GCN-4와 AP-1은 활성산소종 등에 반응하는 것으로 알려져 있으며, 특히 AP-1은 보리 C-hordein 프로모터에서 질소에 반응하는 중요 요소로 알려져 있다 (Muller, M. et al., 1993). 아울러, SWPA2 프로모터에는 증폭부위 (enhancer)로서 oct-1과 C/EBP beta가 존재하며, GCN-4는 세 부위에, AP-1은 두 부위에 존재하고 있다. 특히, -1175와 -1163 사이에는 GCN-4와 AP-1이 역반복서열 (inverted repeat sequence)로 존재하고 있다 (도 3).

상기에서 살펴본 바와 같이, 본 발명의 SAP2 프로모터는 ROS를 비롯한 다양한 스트레스를 인식하는 인자들을 많이 포함하고 있어 환경 스트레스에 대해 내성을 가지는 내성식물체 개발에 매우 유용하게 사용될 수 있다.

〈실시예 4〉 SWPA2 프로모터의 결실 돌연변이체 (deletion mutant) 제조본 발명의 SWPA2 프로모터의 결실 돌연변이체를 제조하기 위하여, SWPA의 프로모터 영역을 Ex Taq polymerase (Takara사)와 서열특이적 프라이머를 이용하여 PCR로 증폭하였다. 이때 프라이머는 서열번호 3 내지 7로 기재되는 상류쪽 프라이머와 서열번호 8로 기재되는 하류쪽 프라이머를 사용하였으며 상기 상류쪽 프라이머는 모두 SalI 제한효소 부위를 포함하고 있으며 하류쪽 프라이머는 BamHI 제한효소 부위를 포함하도록 제조되었다. 상기 프라이머 쌍의 PCR 반응에 의한 결실 크기는 각각 1824, 1314, 968, 602, 354 bp로 증폭되었다 (도 4).

이로부터 얻은 PCR 산물을 제한효소 SalI/BamHI으로 절단한 후 바이너리 벡터로서 GUS 코딩 부분과 NOS 전사종결자 (terminator)를 포함하는 pBI101 플라스미드 벡터 (Clontech)에 상기 DNA 단편을 서브클로닝하였다. 이로부터 -1824, -1314, -968, -602, -354 결실구조 (deletion construction)를 포함하는 SWPA2 프로모터의 결실 돌연변이 플라스미드 벡터 pBS1814, pBS1314, pBS968, pBS602 및 pBS354를 제조하였고 이를 이용하여 transit assay를 실시하였다.

〈실시예 5〉 담배 원형질체를 이용한 SWPA2 프로모터의 transit assaySWPA2 프로모터의 결실 돌연변이체를 이용한 transit assay를 하기와 같이 수행하였다. 우선, 담배 현탁배양 세포 BY-2 (Nicotiana tabacum L. cv. Bright yellow 2)를 이용하여 계대배양한지 3일된 세포를 2% 셀룰라제 R-10과 0.5% 마세로자임 (macerozyme)을 함유하는 효소액에 3시간 동안 처리하여 원형질체를 분리하였다. 여기에 상기 실시예 4에서 제조된 결실 돌연변이체 플라스미드 벡터를 가하여 폴리에틸렌 글리콜 방법을 이용하여 플라스미드 벡터를 세포 내로 도입시킨 후 25℃, 암상태에서 16시간 동안 배양하였다. 결실 돌연변이체 플라스미드 벡터를 포함하는 원형질체의 형광을 Jefferson 등의 방법 (Plant Mol. Biol. Ref., 5, 387-405, 1987)으로 측정함으로써, 프로모터의 활성을 GUS 단백질이 생산된 양으로써 계산하였다.

Transit assay 결과, SWPA2 프로모터 중 특히 -1314의 결실구조가 도입된 경우 CaMV 35S 프로모터를 사용한 경우 보다 약 30배 이상의 높은 GUS 활성을 나타내었다 (도 5).

〈실시예 6〉 SWPA2 프로모터의 효모에서의 발현 SWPA2 프로모터가 효모 (Saccharomyces cerevisiae)에서도 발현되는지 조사하기 위하여 효모/대장균 셔틀벡터 (shuttle vector)인 YEp352 (Hill 등, 1986) 및 S. cerevisiae L3262를 숙주로 사용하였다. 실시예 4에서 제조된 GUS 유전자 및 전사종결신호 (NOS terminator)에 결합된 형태로 SWPA2 프로모터의 결실 돌연변이체를 포함하고 있는 플라스미드 벡터 각각을 YEp352 벡터에 도입한 후 PEG 및 리튬 아세테이트를 이용한 효모 형질전환 방법을 이용하여 효모에 형질전환시켰다. 형질전환된 효모를 SD/URA

-배지 (minimal SD base-Ura DO (drop out) supplement, Clontech)에서 배양하고, 실시예 5와 동일한 방법으로, 형질 전환된 효모로부터 나타나는 형광을 측정하여 프로모터의 활성을 조사하였다.

그 결과, -1314의 결실구조, -1620의 결실구조 및 -1824의 결실구조가 도입된 형질전환 효모에서 CaMV 35S 프로모터 보다 각각 1.6배, 1.4배 및 8.4배 높은 GUS 활성을 나타내었다 (도 6).

<실시예 7> 형질전환 식물체와 배양세포에서 SWPA2 프로모터를 이용한 GUS 발현 <7-1> 식물재료 및 형질전환 식물체의 제조형질전환 식물체의 재료는 담배 (*Nicotiana tabacum* cv. Xanthi)를 사용하였으며, 상기 실시예 4에서 제조된 SWPA2 프로모터의 결실 돌연변이를 포함하는 플라스미드 벡터인 pBS1824 (-1824 결실구조) 및 pBS1314 (-1314 결실구조) 와 CaMV 35S 프로모터에 GUS 유전자가 결합된 pBI121을 도입한 아그로박테리움 튜마파시엔스 (*Agrobacterium tumefaciens*) LBA4404를 각각 상기 담배에 감염시켰다. 감염된 담배를 200 mg/ℓ가나마이신 및 300 mg/ℓ클라포란 (claforan)이 함유된 MS배지 (Murashige T. 등, *Physiol Plant*, 15, 473~497, 1962)에서 배양하여 형질전환 식물체를 선별하였고, 루팅 (rooting)과 슈팅 (shooting) 과정을 거친 후 순화시켜 작은 화분에 옮겨 재배하면서 실험 재료로 사용하였다.

상기 형질전환 식물체 내에 SWPA2 프로모터의 결실 돌연변이가 도입되었는지 확인하기 위하여 서열번호 9 및 10로 기재되는 NPTII 프라이머 쌍과 서열번호 11 및 12으로 기재되는 프로모터 프라이머 쌍을 이용하여 PCR을 수행하였으며, PCR 반응은 NPTII 프라이머 쌍을 사용할 경우에는 95℃ 1분, 65℃ 1분, 72℃ 1분에서 30회, 프로모터 프라이머 쌍을 사용할 경우에는 95℃ 1분, 62℃ 1분, 72℃ 1분에서 30회 수행하였다. 그 결과, 형질전환 식물체에서는 NPTII 프라이머 쌍에 의한 0.7 kb의 DNA 절편과 프로모터 프라이머 쌍에 의한 1.0 kb의 DNA 절편이 검출되었으며 이로부터 상기 형질전환 식물체 내에 외래 유전자가 삽입되었음을 확인하였다.

본 발명에서 선별된, pBS1314 (-1314 결실구조)로 형질전환된 형질전환 담배 캘러스를 생명공학연구소 부설 유전자는 행 (Korean Collection for Type Cultures)에 2000년 10월 16일자로 기탁하였다 (수탁번호: KCTC 0875BP).

<7-2> 형질전환 배양세포의 제조형질전환 배양세포를 제조하기 위하여, 실시예 <7-1> 에서 유전자 도입이 확인된 형질전환 담배 식물체의 잎을 MS 기본배지에 0.1 mg/ℓBAP, 2 mg/ℓNAA, 30 g/ℓ수크로스를 포함하는 캘러스 유도배지에서 배양하여 캘러스를 유도하였으며, 이로부터 유도된 형질전환 담배 세포주로부터 현탁배양을 확립하였다.

<7-3> 스트레스에 의한 형질전환 식물체에서의 GUS 발현 측정 외부적인 환경 스트레스에 의한 형질전환 식물체 내에서 SWPA2 프로모터의 발현양상을 조사하기 위하여 상기 형질전환 식물체에 상처를 주거나 H₂O₂를 처리하여 이로부터 유도되는 GUS 활성을 측정하였다.

우선, 상처에 의한 SWPA2 프로모터의 발현양상을 살펴보기 위하여 형질전환 식물체에 상처를 주고 GUS 활성을 측정하였다. 그 결과, CaMV 35S 프로모터-GUS 유전자를 포함하는 pBI121 벡터가 도입된 형질전환 식물체에서는 상처에 의한 GUS 발현량의 변화가 나타나지 않은 반면, pBS1824 벡터 및 pBS1314 벡터가 각각 도입된 형질전환 식물체에서는 상처 처리 3일 경과 후 GUS의 발현량이 증가하였다 (도 7). pBS1314가 도입된 형질전환 식물체의 경우에는 상처 처리에 의해 GUS의 발현량이 무처리구에 비해 약 3.6배 증가하였다. pBS1824가 도입된 형질전환 식물의 경우에는 상처 처리에 의한 GUS 발현량의 증가가 pBS1314보다는 낮았으나, 상처에 의해 GUS의 발현이 유도되는 것은 pBS1314와 유사한 경향을 나타내었다.

또한, 본 발명자들은 H₂O₂에 의한 SWPA2 프로모터의 발현양상을 확인하기 위하여, 성숙한 잎으로부터 직경 7 mm의 잎 조각 (leaf disk)를 취해 1 mM H₂O₂ 용액에 띄우고 연속광 하에서 배양하였다. 배양 후 GUS 활성을 측정하여 H

2O₂에 의한 SWPA2 프로모터의 발현양상을 살펴보았다. 그 결과, 배양 48시간 경과 후 pBS1314가 도입된 형질전환 식물체의 경우에는 비처리구에 비해 약 58배 GUS 발현량이 증가하였고 CaMV 35S 프로모터 보다는 약 1.7배 높게 GUS 활성이 측정되었다 (도 7). pBS1824가 도입된 형질전환 식물체의 경우에는 H

2O₂에 의해 GUS 발현량이 3.2배 증가하였으며, CaMV 35S 프로모터 보다는 1.2배 높게 GUS 활성이 측정되었다.

아울러, 퍼옥시다제 게놈 유전자 SWPA2의 프로모터 결실 돌연변이체가 도입된 담배의 형질전환 식물체에서 자외선을 조사한 후 유도된 GUS 활성을 측정한 결과, 배양 24시간 경과 후 pBS1314가 도입된 형질전환 식물체의 경우에는 비처리구에 비해 약 5.6배 GUS 발현량이 증가하였고 CaMV 35S 프로모터 보다는 약 1.2배 높은 GUS 활성이 측정되었다 (도 8). pBS1824가 도입된 형질전환 식물체에서도 자외선에 의해 2.5배 높은 GUS 발현이 측정되었다.

<7-4> 캘러스 및 현탁배양에서의 GUS 발현본 발명의 퍼옥시다제 유전자 SWPA2 프로모터가 배양세포의 생장과 관련하여 그 발현이 조절되는지 조사하기 위하여 pBS1314, pBS1824 및 pBI121이 각각 도입된 형질전환 식물체로부터 유도된 형질전환 캘러스에서 GUS 활성을 측정하였다. 그 결과, pBS1314가 도입된 형질전환 캘러스는 pBI121이 도입된 형질전환 캘러스 보다 약 4배 높은 GUS 활성을 나타내었다 (도 10a 및 도 10b).

또한, 형질전환 캘러스에서 유도된 현탁배양세포에서 GUS의 활성변화를 조사한 결과, pBS1314, pBS1824 및 pBI121이 도입된 형질전환 세포는 동일한 생장을 보여 배양 15일 경과 후 정체기에 도달하였다 (도 11a 및 도 11b). pBI121이 도입된 형질전환 세포에서의 GUS 활성은 세포의 생장시기에 무관하게 비교적 낮은 수준으로 일정하게 유지되었다. pBS1824이 도입된 형질전환 세포에서도 세포생장에 무관하게 일정한 수준의 GUS를 발현하고 있었으나, pBI121보다는 높은 발현량을 유지하였다. 반면, pBS1314이 도입된 형질전환 세포에서는 세포배양 5 내지 7일 사이에는 낮은 수준으로 GUS를 발현하다가 배양 7일 경과 후부터 GUS 발현량이 급격하게 증가되었고, 배양 15일 경과 후에는 최고의 발현량이 나타나 배양후기까지 유지되었다.

발명의 효과

본 발명은 고구마 배양세포로부터 환경 스트레스 조건에서 강하게 발현하는 신규의 퍼옥시다제 유전자 SWPA2 및 상기 유전자의 프로모터를 제공한다. 본 발명의 퍼옥시다제 게놈 유전자 SWPA2 프로모터는 각종 환경 스트레스를 인식하는 영역을 여러 부위 포함하고 있으며 형질전환 식물체로부터 목적하는 유전자를 발현시키기 위하여 일반적으로 많이 사용되고 있는 CaMV 35S 프로모터에 비해 트랜짓 분석 (transit assay)에서 30배 높은 활성을 나타내므로 상기 프로모터의 전체 또는 일부를 세포, 식물체, 미생물 및 박테리아 등의 형질전환체 개발에 이용하면 환경 스트레스에 대해 내성을 가지는 내성식물체 개발과 유용성분을 대량으로 생산할 수 있는 형질전환 생물체 개발에 유용하게 이용될 수 있다.

(57)청구의 범위

청구항1

서열번호 1로 기재되는 염기서열의 전체 또는 그것의 일부로 이루어지며, swpa2 염기서열 또는 그것의 변이체로 이루어지는 DNA 서열에 의해 코딩되는 퍼옥시다제를 코딩하는 게놈 유전자.

청구항2

서열번호 2로 기재되는 염기서열 중 1 내지 1824번 또는 그것의 일부로 이루어지며 프로모터 활성을 나타내는 DNA 서열.

청구항3

제 2항에 있어서, 상기 프로모터 활성이 환경 스트레스에 의해 유도되는 DNA 서열.

청구항4

제 3항에 있어서, 상기 환경 스트레스가 상처, 활성산소종, 열, 수분, 온도, 염, 대기오염, 자외선 또는 중금속에 의한 스트레스인 DNA 서열.

청구항5

서열번호 2로 기재되는 염기서열 중 1 내지 1824번 또는 그것의 일부로 이루어지며 프로모터 활성을 나타내는 DNA 서열 및 이것과 작동가능하도록 연결되며 유용물질을 코딩하는 DNA 서열로 이루어지는 DNA 구조물.

청구항6

제 5항에 있어서, 상기 프로모터 활성을 나타내는 DNA 서열은 ABA, 메틸 자스모네이트, 상처, 저산소증, 활성산소종, 열 또는 질소에 의한 스트레스를 인식하는 인자를 포함하는 것을 특징으로 하는 DNA 서열.

청구항7

- 1) 서열번호 2의 염기서열 중 1 내지 1824번 또는 그것의 일부로 이루어지며 프로모터 활성을 나타내는 DNA 서열 및 이것과 작동가능하게 연결되며 유용물질을 코딩하는 DNA 서열로 이루어지는 발현벡터를 제조하는 단계;
- 2) 숙주세포에 상기 발현벡터를 도입하는 단계; 및
- 3) 상기 발현벡터가 도입된 형질전환체를 선별하는 단계로 이루어지는 스트레스에 의해 유용물질 생산이 유도되는 형질전환체의 제조방법.

청구항8

제 7항에 있어서, 유용물질은 약리효과를 발휘하는 다양한 단백질이나 펩타이드, 형질전환체에 스트레스에 대한 내성을

부여하는 물질인 것을 특징으로 하는 제조방법.

청구항9

제 7항에 있어서, 상기 단계 2)의 숙주세포는 식물세포, 동물세포 및 미생물로 구성된 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 제조방법.

청구항10

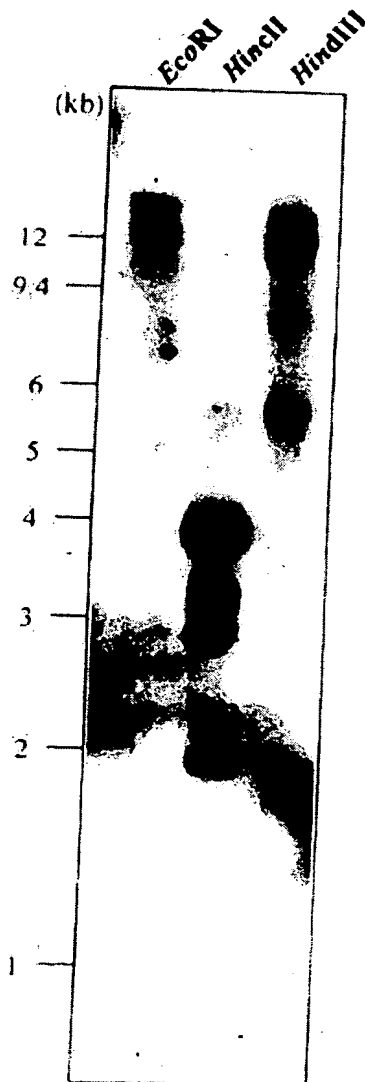
제 7항에 있어서, 상기 형질전환체는 미생물, 식물세포, 식물체 및 이로부터 유래된 캘러스로 구성된 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 제조방법.

청구항11

제 7항의 제조방법에 의해 생산된 형질전환 담배 캘러스 (수탁번호: KCTC 0875BP).

도면

도면1



swpa2

도면 2a

tttttagtactactcatgtrcaaatccctgttacaataaaaatagtttcaaatctactgaaa	-1828
ctcaaaactataaacccttatttggatagaggtcactctatacaacttagaccacggaattgt	-1800
caactagaccacggaattgttagcttgtttattgtatttcacgtataattttgagtgaat	-1740
catcaactttgacgggcaaaaatagatagcatgtggcgggccacagtttcaaaattcataca	-1680
agatgtcaaggggaccggcccggtggctgcgtgcataacacgtgcaagattgttgaatt	-1620
ctttctagattcccttttatccctttcttctttcttgaaaaaatagaaacagaaatttat	-1560
gtaaataaaaaataataataatgtgtttccatactctataagcatatcatatggtgcattgc	-1500
acatatttcatcgcacaaagaaagccacgggtgcagacgctcgaattttgacattttacaact	-1440
tacaaggccatgatcagatcgataataaccaaatgggtaccaccatacagggtgatatata	-1380
tatgtatgttcattatrttaaaactgtattacaaagactatrtttttcattaatgtgtacaaa	-1320
gaaaaattaaacagaaaaagaaaggaaataatgaactcaccaccatagcaccttagacacctag	-1260
acaccaagtacccaaacccctctattttccacatctattttcagatgtaaatatgaggtgg	-1200
acgaagaagggtgttagcgaattatttggatttaattcttgcctacgataattatgataccactcac	-1140
ttagtccatttttttcagaccaagacaaacttagctttagttttttatgtatgtgtggtcgga	-1080
cgttttttgtaaataaaaaaataaaagtgtgcataatatatagtgtagattaaagtaattg	-1020
atcaatcaacggttaaatrttgcattttatcgggaagggtggagggttcnaactttccagtcgaa	-960
cttagagagtcatttggagacccttgaccaggttaacttagcgggtgtcgaaaacctgcacaaact	-900
tgagatttaatttgcataccccttttatataacgcggttttatttttttttccatagaana	-840
atttggagaanaataagaaatgttatctgttgaaagctaggccaaaaacgaatgtcttttc	-780
gtcgttttcgttaaagggttagatcataattccatctgggtccaacacttaaaacttgtataa	-720
tggaagaaattattagtcatttttagacctaccgggttagcgcgaactttttgttttccataa	-660
agattcgataaattgcattggccagatgcaaaagtgtgaatttaattgtttgccaattccctat	-600
catacaccacaacacatgtctcagggccaaagtggcaccagcaaacattccctgtcatatt	-540
aatrttttttaattgagaaggaggaaacttcacagctatttactcgaagggtatataaatttgag	-480
taaatcttacttttgtgattcttagttgacaaaacaccgcgaagataaaactataactaagtcca	-420
aatcacctcacccgggttggctcagatttgggtttttcaatacaagaggggggtgtgaactcc	-360
cgtgcccgaacctcttttgagggaacaataatgtacggtcacgccaaccaagcttgatttttt	-300
ntgacaaataataattactacataataattacacgggtcaaaataattaatcaaaaaataaaaa	-240
gaccccaattaaagtcccccaaccactctcaaatatcttatttaagggaaccccttagaggc	-180
aatccaatgcactctcaaccccccttcttcttcttcttcttcttcttcttcttcttcttctt	-120
ATGGCTTCATTGTGAGTCGGCTCAGTCTTGCGCTAAGCCTCATAGCTCTAGCTCTAGCT	-60
M A S I V S R L S L A L S L I A L A L A	+60
GGCTACTCCATTACAGCACACACAGTCAGCCATGGAGAGCCAGCCCATCAAGGCTCTC	+120
G Y S I Y Q H T Q S A M E S Q P I K A L	
COGGCGTGGCTACAGCTCCCCACGTTCCAATCTGCCAACGTGTTATCGTATTATCOGAGT	+180
P A W L Q L P T F Q S A N V L S Y Y P S	
GGCCGCAAATCCTCCCCCGCCGGCATGCTTCCGACGAAGCTTGCGTGTCTCCGCCGCTT	+240
G R K S S P A G M L S D E A C V F S A V	
AAAGAAGTTGTGCAGCGCCGCCATCGATAACGAAACTCGCATGGGGGCTTCCCTCATTGCT	+300
K E V V D A A I D N E T R M G A S L I R	
CTCTTCTTCCACGATTGCTTGTGATGtagctatagtatacataataatgttaaaacc	+360
L F F H D C F V D	
tatatatatatatatatatatatatatatacatgcaaaaaagtttataataactaatatata	+420

도면2b

```

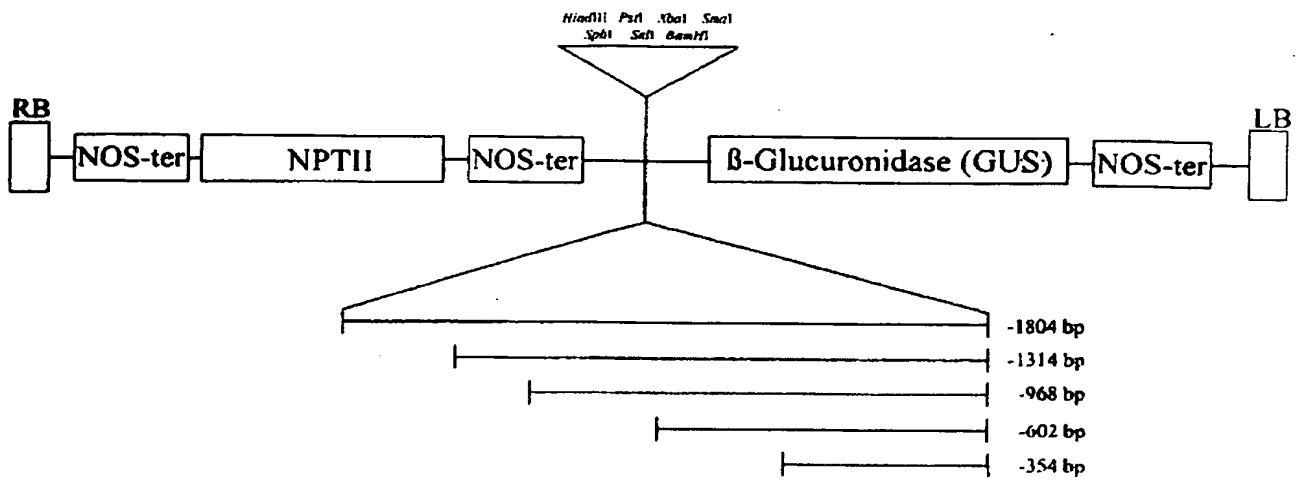
ccctactctctctgcatatcatttatatatattaacacgatttatattcaaaaccaataat +480
attatatatatatatagtttaactatcttttctttcacctttcttatcacttttcaaat +540
gttaaatcttaaaatttaattgtttattttattgaattttttctattttctattttgtttta +600
agacttaattatactattattttaactgggctggtaactttccgtcaatattgtratttta +660
acaattgttaacaaattaaaaccaattgttaacaatagtagttaaagatcaaaagtgcacata +720
accagcttaagtttttttaattggacgaactcaaaacaaaagtcattatgttaatttcgg +780
tagagaagtcataatttaaaattttcatagtttatcaaatcaattgtttttcaaccagcta +840
gggtgntctattttcaaaaactaattagacattgggtgtgcatgaaacattacgtttaaaca +900
aagtcattcaccacacctcgtctttataattgggtgtacctaagttatcacacgttcctgtcga +960
acttacacgccaaacatgtcaatagttcaaatgtcttttaataaaataattattagattat +1020
tatttatcttaatactaaattttcttcttcgttaaaattttgtgtgtattaggttggatgc +1080
                                     G C D A
AGGGCTTCTTTTGAATGATACGGCGACGTTACAGGGGAACAACTGCATTGGCAATCT +1140
G T T T N D T A T F T G E Q T A F G N L
TAATTCGCTGAGAGGGTTTGAGGTTATAGAACAAGCTAAACAGAATGCAGTAGCTAAATG +1200
N S V R G F E V I E Q A K Q N A V A K C
TGCGATACACCGGTATCTTGTGCTGACATTTTATCTATTGCTGCTCGTGATTCTTTTGA +1260
A D T P V S C A D I L S I A A R D S F E
ACGGgttaagtccttcaatatcgtgtataagtggtactaataatgtcaatatgtttacatgta +1320
R
gacatgtattttattttattttctttgtattttacattcaacagtttagtgagcaacataca +1380
                                     F S G A T Y
CTGTGACTTTAGGGCGACTCGATGCGAGAACCGCGAACTTAACCGGAGCTAATACCCAGC +1440
T V T L G R L D A R T A N L T G A N T Q
TTGTGCGACCATCGGAAAACCTGACTGAACAAGTCAGGAAATTTGGCATCAAAGGATTTA +1500
L V G P S E N L T E Q V R K F G I K G F
ACGAGAGGGGAATTGGTCGCCTTGTGGGTTACACACGCTAGGGTTTGCCAGATGTCCGG +1560
M E R E L V A L L G S H T L G F A R C P
TTTTATGTGACAACAGAAACATTAACCCGGTTCGGGTCCCGGTCTGCAATGCAACTGTC +1620
V L C D N R N I N P V R V P G L Q C N C
CTGTAACATAACTGACOCGGGTTTGGTGGGGCTGGACCCACACCCGATACATTCCGACC +1680
P V T N T D P G L V G L D P T P D T F D
AACGTTATTACTCTGACCTAGTCAGCGGCCAAGGECTCCTGTTTTCCGACCAACAGCTGA +1740
Q R Y Y S D L V S G Q G L L F S D Q Q L
TGAACAGCACCACCAGCGACGCGTGACGACGTACCGTCACTCCATAGACACCTTCC +1800
M N S T T T S D A V T T Y R D S I D T F
TTGCGGACTTCGCGGCGCCATGGTCAAGATGAGCAACCTGCTCCGTCCGCGGGAGTTG +1860
L A D F A A A M V K M S N L P P S A G V
AGCTCGAAATCCGTGACGTCTGCAGCCGGGTGAATGACGTCTCTGTTGCATCC +1913
E L E I R D V C S R V N D V S V A S

```

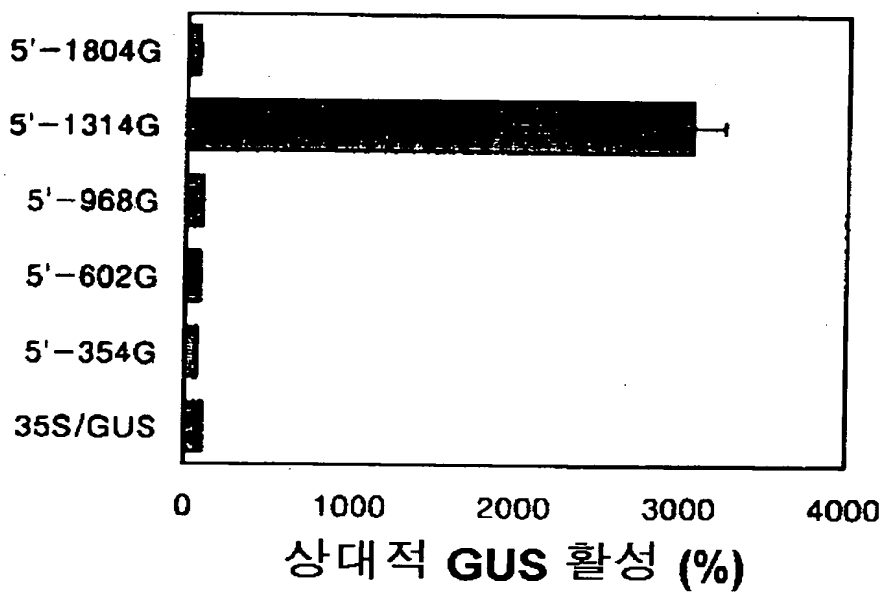
도면3

ttaattttcaatattttgtctgtattttt -1804
 ttttttagtactactcatgtcaaactcctgttacatataaaatagtgtcaaattcactgaaa -1780
 ctcaaactctataacctctttattttgatagagtcactctatacaacttagaccacggaattgt -1720
 GCN4
 caactagaccacggaattgttagctgtttattgtattcacgtataattttgatgaatat -1680
 catcaacttttgacgggcaaaatagatagcatgtggcgccacagtttcaaaattcataca -1620
 agatgtcaaggggaccggccgggtggctgctgcataatcacgtgcaagattttgtgaaatt -1560
 ctttctagattcccttttatecttttcttcttcttgaaaaaatagaaacagaaatttat -1500
 gtaaat~~aaaaataa~~taataatgtggtttccatactctatagcatatcatatgggtgcattgc -1440
 acatattttcatcgacaaagaaagccacgggtgcagacgctcgattttgacattttacaact -1380
 tacaaggccatgatcagatcgataataaccaaattggtaccacctaactagggtgatatatat -1320
 tatgtatgtcattattttgaactgtattacaagactattttttcattaattgggtacaaa -1260
 oct-1
 gaaaaattaaacagaaaaagaaagga~~aaaaa~~taactcacccaccttagcaccttagacaccttag -1200
 HSTF GCN4 AP-1
 acaccaagtagcccaaacctcttattttcaacatctattttcagatgtaaatatgagttgg -1140
 acgaagaagggttagcaattatttggattaatcttgcctacgataattatgatccactcac -1080
 ttagtcatttttttcagaccaagacaacttagcttgagttttttattgtatgtgggtcggaa -1020
 AP-1
 cgttttttgaattaa~~aaaaataa~~aagttgcatttatatatgttagatttaagtaattg -960
 CCAAT/enhancer
 atcaatcaacgttttaattttgcatttatcggcaagggtggaggttccaacttcagtcgaa -900
 CAAT box
 cttagaagatcatttggagaccttgaccagtttaactagcgggtgtcgaaaacctgcacaact -840
 GCN4
 tgagattttaattgcataacctttttatataatgacgcgttttttttttttcttagaaaaata -780
 TATA box
 atttggaga~~aaaaataa~~gaatattgtattctgtgaaagctaggccaaaacgaatgtcttttc -720
 gtcgttttcgttaaagggttagatcatatttcatctggtccaacactcaaaacttgataaa -660
 tggacgaattatttagtcatttttagac~~ctaccggt~~tagcgcgactttttgttttccataa -600
 motif-P
 agattcgataattgcatggccagatgcaaagtttgaaatttaattgtttgccaaatcctat -540
 catacaccacaacacatgtctttaggg~~ccaaatggc~~accagcaaacattcctgtcataatt -480
 G-box
 aatttttttaatgagaaggaggaaactcacagctattactcgaagggtatataatattgag -420
 taaatcttactttgtgattctagttgacaaaacaccgcaagataaactataactaagttca -360
 aatcacctcaccgggttggctcagattgggtttttcaataca~~agagggggtgtg~~actcc -300
 SP-1
 cgtgccgacctcttttgagggacaataatgtacgggtcacgccaaccaagcttgatttttt -240
 ctgacaaatatattactacatatattacacgggtcaaataattaatca~~aaaaataa~~aaaaa -180
 gacc~~caatt~~aaagtccccaaccactctcaaatattctatttaagggaaccttagaggc -120
 aattcatgcatcctcaacccctttcttctcattttcttaattctacattttcctttgacc -60
 ATGGCTTCCATTGTGAGTCGGCTCAGTCTTGCGCTAAGCCTCATAGCTCTAGCTCTAGCT +60
 M A S I V S R L S L A L S L I A L A L A

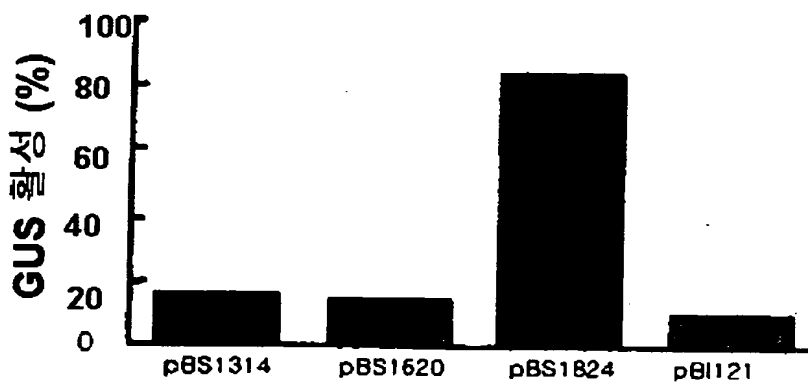
도면4



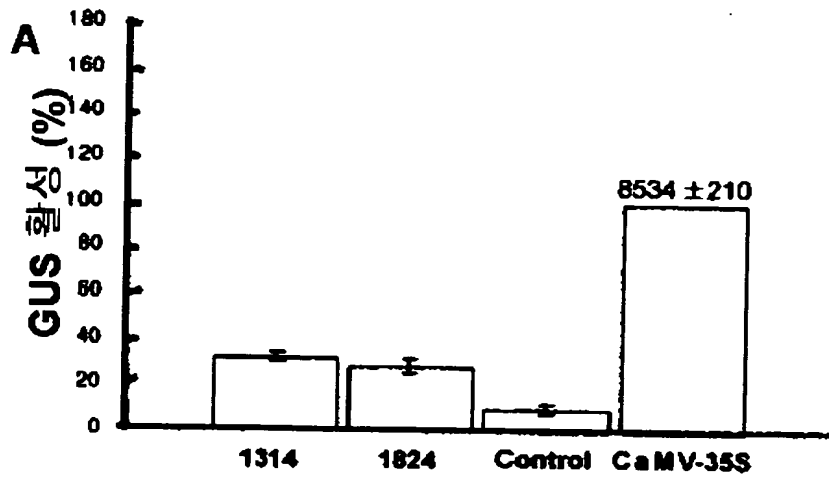
도면5



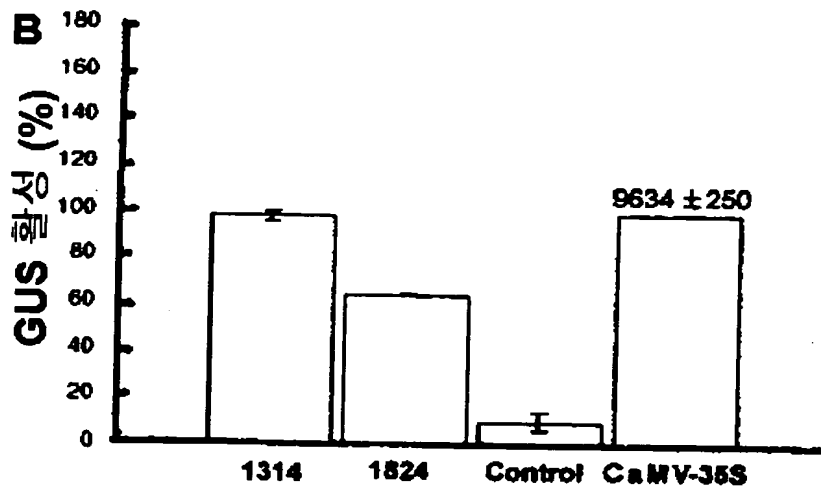
도면6



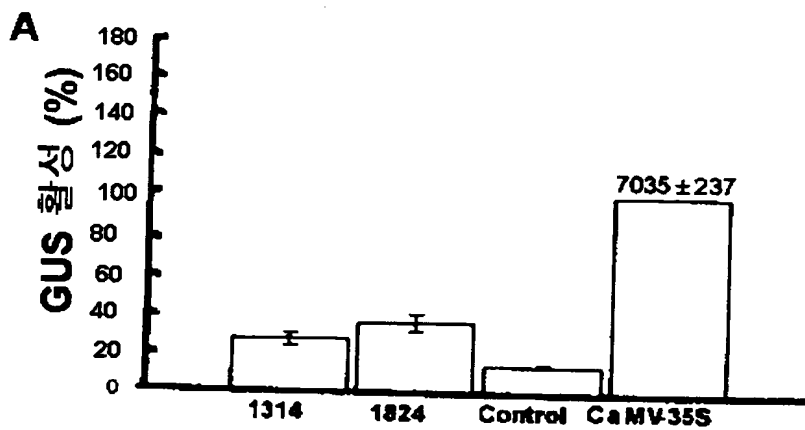
도면7a



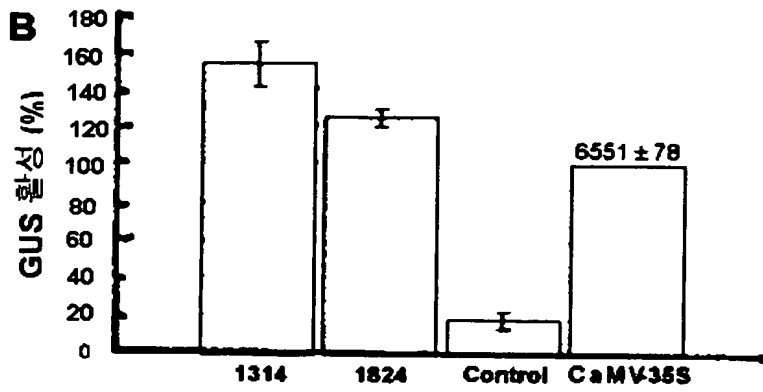
도면7b



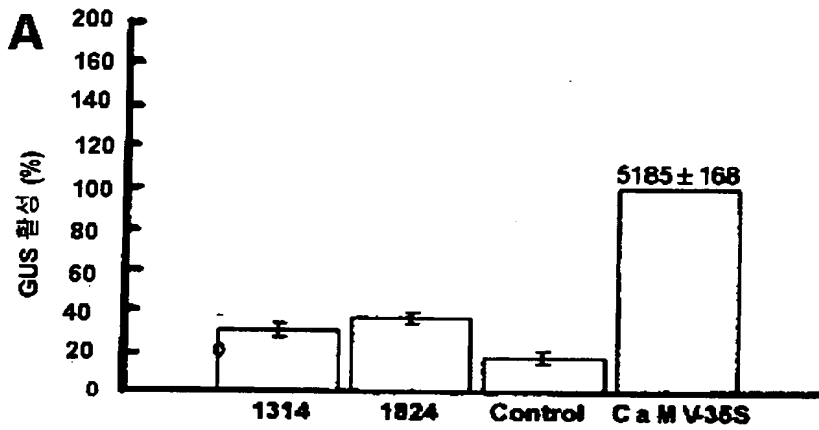
도면8a



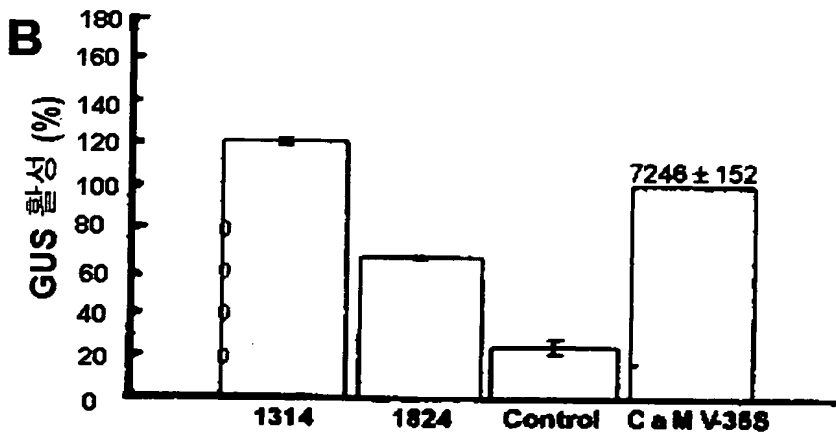
도면8b



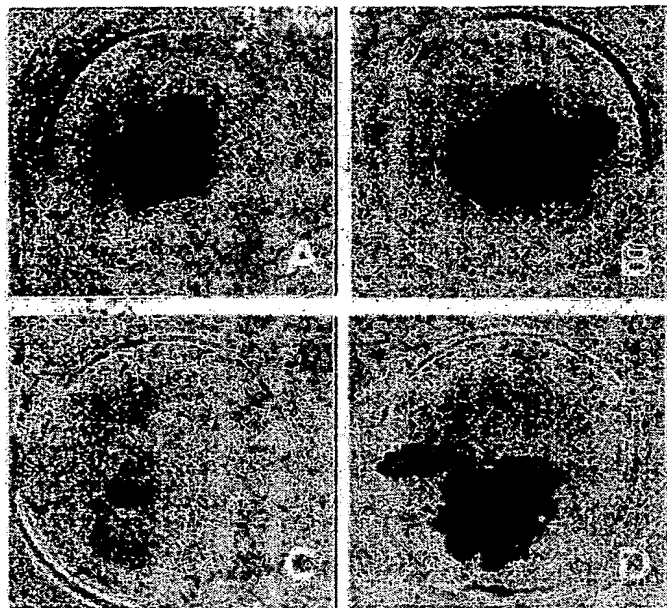
도면9a



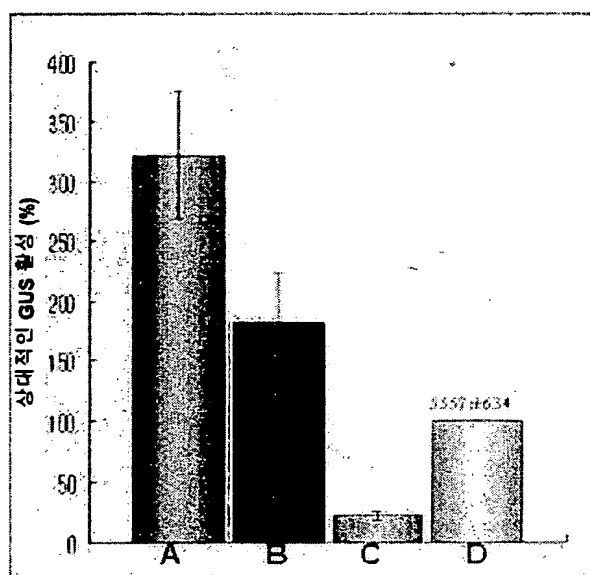
도면9b



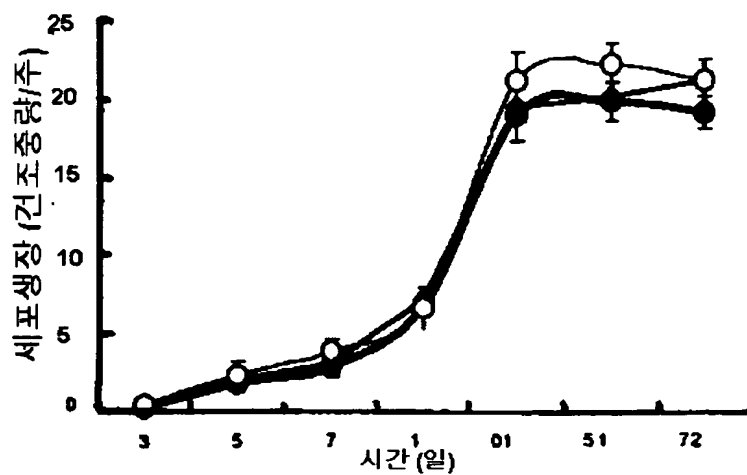
도면14



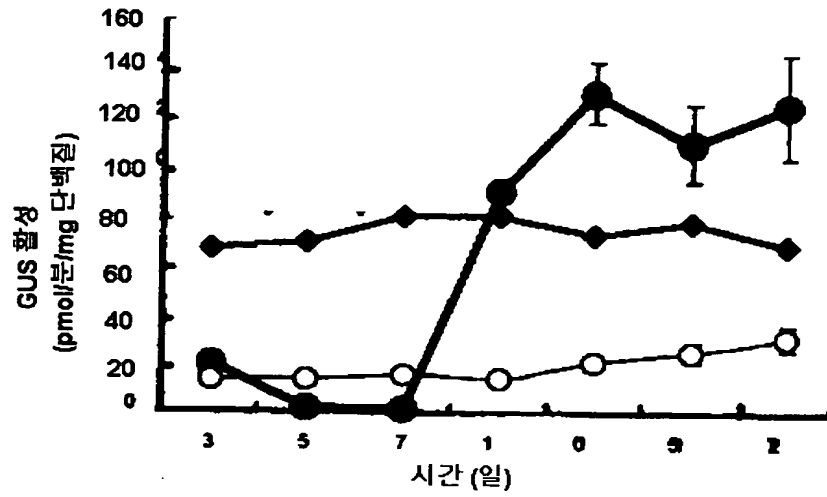
도면15



도면11a



도면11b



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☒ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.